

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-116967

(43)Date of publication of application : 14.05.1996

(51)Int.Cl.

C12N 9/06

C12Q 1/04

C12Q 1/26

(21)Application number : 06-282628

(71)Applicant : AMANO PHARMACEUT CO LTD
KDK CORP

(22)Date of filing : 20.10.1994

(72)Inventor : KIMURA SHIGEKI
MIZUTANI SATOSHI
SAKAMOTO HISASHI

(54) ACCELERATION OF DIAPHORASE REACTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To manifest the activity of a diaphorase sufficiently even in a measurement system in which there happens only very weak or no oxidation-reduction reactions by reducing or removing the oxygen dissolved in the reaction system.

CONSTITUTION: The oxygen dissolved in a reaction system comprising reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) or reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphoric acid (NADPH), an electron acceptor (a tetrazolium salt as a color-developing electron acceptor) and a diaphorase is reduced or removed therefrom. Thus, the activity of the diaphorase can sufficiently be manifested to promote the reaction of diaphorase.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(5) [JP-A-H8-116967]

Paragraph [0002]

[Prior Art]

Diaphorase is an enzyme having an activity to catalyze a reaction to oxidize NADH or NADPH with a pigment such as potassium ferricyanide, methylene blue, 2,6-dichloroindophenol, a tetrazolium salt or the like (diaphorase activity), and has been widely distributed over microorganisms such as bacteria, yeast and the like as well as mammals.

Paragraph [0006]

Furthermore, processes for electrochemically measuring a reaction between diaphorase and NADH or NADPH have been also carried out, and as this type of process, a process in which a ferrocene derivative or an indole derivative is used as a substance that mediates the enzymatic reaction and the electrode reaction, i.e., a mediator (JP-A-S62-167465), a process in which an aminophenyl is used (JP-A-H5-196601), or the like has been known.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-116967

(43)公開日 平成8年(1996)5月14日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/06	Z			
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
1/26		6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平6-282628

(22)出願日 平成6年(1994)10月20日

(71)出願人 000216162

天野製薬株式会社

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

(71)出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72)発明者 木村 茂樹

愛知県西春日井郡西春町大字九之坪西城屋

敷51 天野製薬株式会社中央研究所内

(72)発明者 水谷 智

京都市南区東九条西明田町57番地 株式会社京都第一科学内

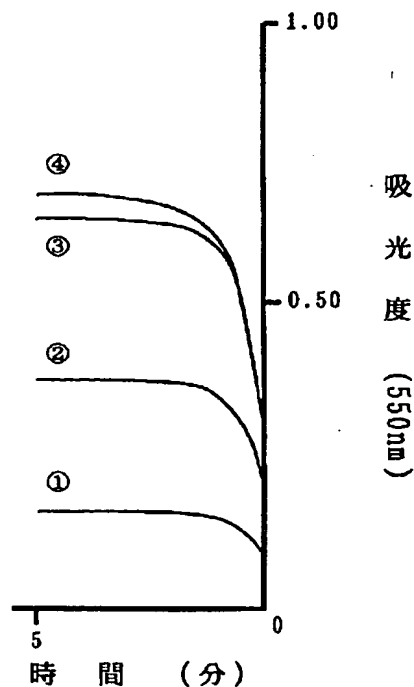
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ジアホラーゼの反応促進方法

(57)【要約】

【目的】ジアホラーゼの反応促進方法に関する。

【構成】還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸と電子受容体との反応において、反応系中の溶存酸素を減少或いは除去することによってジアホラーゼの反応を促進する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドまたは還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸、電子受容体及びジアホラーゼの反応系において、反応系中の溶存酸素を減少或いは除去することを特徴とするジアホラーゼの反応促進方法。

【請求項2】電子受容体がテトラゾリウム塩からなることを特徴とする請求項1記載のジアホラーゼの反応促進方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は、ジアホラーゼの反応促進方法に関する。より詳細には還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下、酸化型をNAD⁺、還元型をNADHと略す）または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸（以下、酸化型をNADP⁺、還元型をNADPHと略す）と電子受容体との反応において、その反応の触媒作用をするジアホラーゼの反応性が、反応系中の溶存酸素を減少或いは除去することによって促進される方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ジアホラーゼはNADH又はNADPHをフェリシアン化カリウム、メチレンブルー、2,6-ジクロロインドフェノール、テトラゾリウム塩等の色素で酸化する反応を触媒する活性（ジアホラーゼ活性）を持つ酵素で細菌、酵母等の微生物から哺乳類動物まで広く分布する。

【0003】ジアホラーゼによりNAD⁺又はNADP⁺依存性の脱水素酵素類による基質からの脱水素反応により生成されるNADH又はNADPHは、電子受容体で酸化され、電子受容体は還元型となる。

【0004】この反応は広く応用され、NADH量又はNADPH量の測定用試薬、脱水素酵素量又はその基質量測定試薬或いは脱水素酵素を含んだ混合酵素反応系試薬として生化学試薬、電気泳動用試薬、ドライケミストリー用試薬等に使用されている。

【0005】上記の反応系に使用する電子受容体としては通常は発色性電子受容体としてのテトラゾリウム塩が多く使用され、これをホルマザンに導びき、比色定量する方法が一般的である。

【0006】また、ジアホラーゼとNADH又はNADPHの反応を電気化学的に測定する方法も行われ、この方法において酵素反応と電極反応の仲立ちをする物質（メディエーター）としてフェロセン誘導体やインドール誘導体を用いる方法（特開昭62-167465）或いはアミノフェニール類を用いる方法（特開平5-196601）等が知られている。

【0007】しかしながら、ジアホラーゼの特徴を研究し、還元型色素の生成を増加させる為に、測定系そのものの反応環境に各種の操作を行うことや、測定試薬や測定条件に各種の試みを行うなどの検討は全くなされてい

ない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】現在、各種の成分や酵素活性を測定するために、各種の酵素が利用されている。その酵素反応を促進するためには各種の添加物を使用する方法や酵素反応による反応生成物を系外に除去する方法が一般的に用いられてきたが、これらの方法は各種の添加物が他の反応系に及ぼす影響を考慮する必要があったり、試薬系が複雑になり、副反応などの影響が出るなどの問題がある。

【0009】ましてや、現在ジアホラーゼについてはこれらの添加物や反応系の改良についての検討は非常に少ない状況である。本発明は、ジアホラーゼそのものの性質に着目し、今まで酸化還元反応が弱かったり又は起こらなかった測定系においても活性を十分に発現させることができる方法を提供することを目的とするものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ジアホラーゼの活性は反応系中に存在する溶存酸素の影響を大きく受けることを見出し、この溶存酸素を減少若しくは除去することによって十分な酵素活性の発現による十分な還元型色素の生成を行うことができることを知り本発明を完成した。

【0011】即ち本発明は、NADH又はNADPH、電子受容体及びジアホラーゼの反応系において、反応系中の溶存酸素を減少或いは除去することを特徴とする該反応を促進する方法である。

【0012】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の方法においては、NADH又はNADPH、電子受容体及びジアホラーゼを用いる反応系中に存在する溶存酸素を適当な手段を講じて減少或いは除去することによりジアホラーゼの反応を促進させることができる。

【0013】本発明において、電子受容体としては通常は発色性電子受容体が使用される。代表的なものとしては、ジクロロフェノールインドフェノール（DCPIP）、ニトロブルーテトラゾリウム（NTB）、テトラゾリウムバイオレット（TV）、ヨードテトラゾリウム（INT）等が挙げられる。

【0014】電子受容体としてはより好ましくは本発明の方法による効果が明確に現れるTVが使用される。また、本発明に用いられるジアホラーゼの起源、精製度などは問わない。

【0015】本発明の反応系の溶存酸素を減少或いは除去する方法としては、例えば物理的な方法、化学的な方法、酵素を用いる方法等が用いられる。

【0016】物理的な方法としては例えば、脱気法、置換法等が挙げられる。脱気法としては、真空ポンプなどを用いて反応に使用する溶液中の溶存酸素を減少或いは

10

20

30

40

50

取り除く方法や、メンブランフィルターを用いる方法などがあり、置換法としては窒素、二酸化炭素等を反応に使用する溶液中に爆気し、溶存酸素を当該ガスで置換する方法などがある。その条件としてはその対照とする溶液の容量、温度等により変化する。

【0017】化学的な方法としては酸素吸収剤を使用する方法が挙げられるが、通常はジアホラーゼの反応系に及ぼす影響が大きい使用が非常に困難である。

【0018】酵素を用いる方法としては、溶存酸素を消費する酸化酵素と基質の組み合わせが通常用いられる。例えばグルコースオキシダーゼ（以下、GOとも記す）とグルコース、コレステロールオキシダーゼとコレステロール、ウリカーゼと尿酸、キサンチンオキシダーゼとキサンチン、アスコルビン酸オキシダーゼとアスコルビン酸等の組み合わせが用いられる。対照とする溶液中の溶存酸素を消費するのに十分な量を加えることにより、反応液中の溶存酸素は著しく減少或いは完全に消去することができる。

【0019】上記の方法のうちで酵素を用いた方法が、その適用の容易さや、効果の点でより好ましく利用される。以下、実施例で本発明を詳細に示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0020】

【実施例】

実施例1

ジアホラーゼとしてはジアホラーゼ"Amano"（天野製薬製）を使用し、各種条件での窒素置換を行った。以下の試薬組成において、NADPHを0.06mM添加して波長550nmで反応時間5分の吸光度変化を測定した

【0021】ACES 緩衝液(pH7.5)	0.3 M
BSA	1.0 %
TV	3.2 mM
トリトンX-100	1.5 %
ジアホラーゼ	1.0 U/ml

【0022】窒素置換の条件：反応液100mlに対して窒素ガス（流量100ml/min）を30秒、300秒及び600秒爆気した。対照として窒素置換を行わない場合についても測定した。その結果を図1に示す。

【0023】図1より明らかなように、窒素置換を行うことによってジアホラーゼの反応性が促進されていることがわかる。その置換の程度をコントロールすることによって感度をコントロールすることも可能である。

【0024】実施例2

実施例1の試薬組成に更に、グルコース1.0mg/ml、グルコースオキシダーゼ（天野製薬製）10.0u/mlを加え37℃で5分間反応後、NADPHを0.03mM及び0.06mM添加してそのタイムコースを測定した。対照としてグルコース、グルコースオキシダーゼを添加しない測定系でも同様に測定した。その結果を図2に示す。

【0025】図2よりも明らかなように、グルコース及

びグルコースオキシダーゼを用いて予め反応系の溶存酸素を消費することによって、ジアホラーゼの反応が著しく促進されることがわかる。

【0026】実施例3

実施例1の試薬組成にグルコースのみを1.0mg/mlを加えた試薬を用い、グルコースオキシダーゼ 10u/ml及びNADPHを同時に添加して測定した。但し、NADPHの量としては0.03mM、0.06mM及び0.12mMを用いた。対照としては、グルコース及びグルコースオキシダーゼを用いて予め反応した試薬を使用した場合と、グルコース及びグルコースオキシダーゼを使用しない条件で測定した。その結果を図3及び図4に示す。

【0027】図3よりグルコースオキシダーゼを予め添加した場合と比べればその効果は大きくないが、明らかにグルコース及びグルコースオキシダーゼで溶存酸素を消去しない反応系より反応促進効果が明らかに認められた。図4にはNADPHの濃度変化とその反応直線性を示すが、これよりも明らかなように何れの場合にもその反応直線性は良好であるため、溶存酸素の除去程度を変化させることにより同一試薬組成であってもその測定の範囲を変えることができる。

【0028】実施例4

実施例3においてグルコースオキシダーゼの添加量を変化させて測定した。その結果を図5に示す。

【0029】その結果、2倍量の20u/ml使用した場合にはグルコース及びグルコースオキシダーゼで予め溶存酸素を除去した場合の反応促進効果と同等の結果が得られた。

【0030】実施例5

実施例2のグルコース及びグルコースオキシダーゼに代えてコレステロール0.5mg/ml及びコレステロールオキシダーゼ10u/mlを用いた場合にも同様に溶存酸素が消去され、ジアホラーゼの反応性が明らかに促進された。

【0031】また、ウリカーゼと尿酸、キサンチンオキシダーゼとキサンチン、アスコルビン酸オキシダーゼとアスコルビン酸を用いた場合にも同様な結果が得られた。

【0032】

【発明の効果】本発明により、ジアホラーゼそのものの性質に着目し、従来の測定系においても活性を十分に発現させることができる方法が提供される。即ち測定系の溶存酸素を減少若しくは除去することによってジアホラーゼの反応を促進することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の結果を示す。図中で①は爆気しない場合を示し、②、③、④は各々30秒、300秒、600秒の爆気した場合の反応タイムコースを示す。

【図2】実施例2の結果を示す。図中で①はNADPH 0.03mMでグルコース及びグルコースオキシダーゼによる処理を行わない場合を示し、③はグルコース及びグルコース

オキシダーゼによる処理を行った場合を示す。また、②はNADPH 0.06mMでグルコース及びグルコースオキシダーゼによる処理を行わない場合を示し、④はグルコース及びグルコースオキシダーゼによる処理を行った場合を示す。

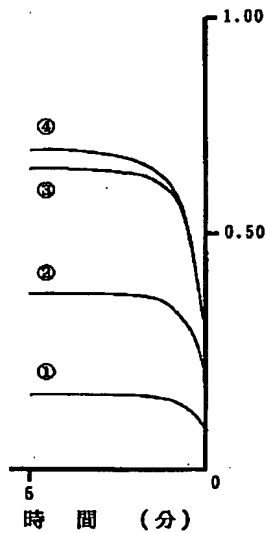
【図3】実施例3の結果を示す。図中で①はグルコース及びグルコースオキシダーゼによる処理を行わない場合を示し、②はグルコースオキシダーゼとNADPHの同時添加の場合を示し、③はグルコース及びグルコースオキシダーゼの前処理を行った場合を示す。

【図4】実施例3に結果についてその反応直線性を示す。図中で黒丸はグルコース及びグルコースオキシダー

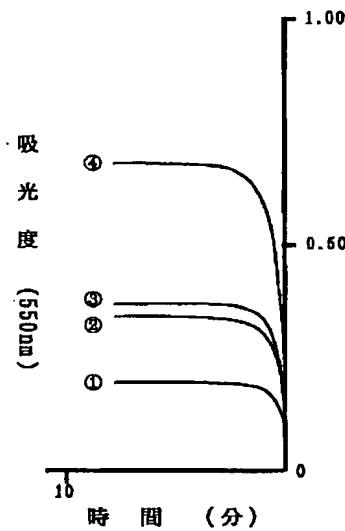
ゼの前処理を行った場合を示し、白丸はグルコースオキシダーゼとNADPHの同時添加の場合を示し、黒三角はグルコース及びグルコースオキシダーゼによる処理を行わない場合を示す。

【図5】実施例4の結果を示す。図中で①はグルコース及びグルコースオキシダーゼを使用しない場合を示し、②はグルコース及びグルコースオキシダーゼを用いて予め溶存酸素を除去した場合の結果を示す。③、④及び⑤はグルコースオキシダーゼとNADPHを同時に添加する場合を示し、グルコースオキシダーゼの添加量は各々5u/ml、10u/ml及び20u/mlの場合を示す。

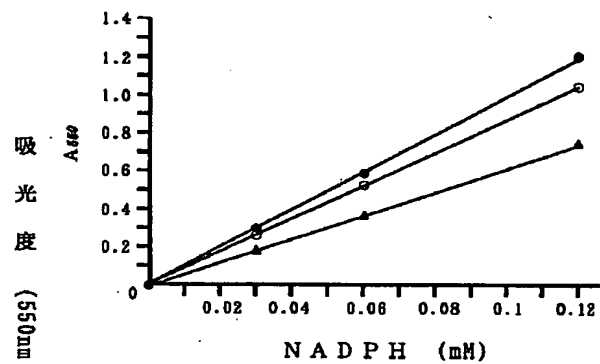
【図1】



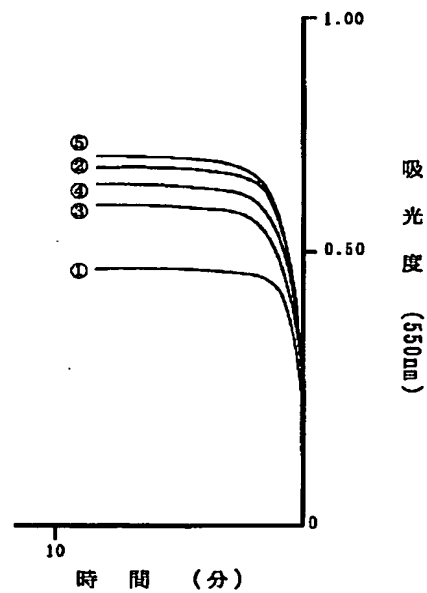
【図2】



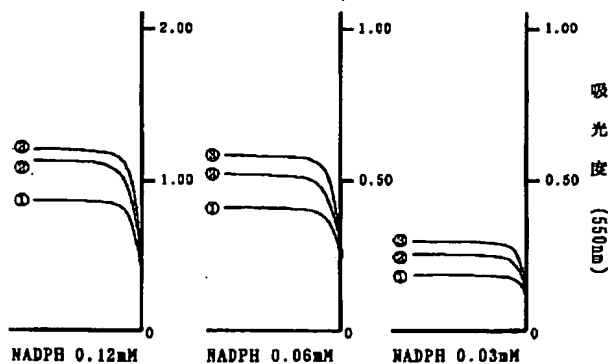
【図4】



【図5】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 坂本 久

京都市南区東九条西明田町57番地 株式会
社京都第一科学内